

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 :	C09B 11/02, 11/26, G01N 33/533, 33/58, C07H 21/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/64987
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. November 2000 (02.11.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP00/03569		
(22) Internationales Anmeldedatum:	19. April 2000 (19.04.00)		
(30) Prioritätsdaten:	199 19 120.4	27. April 1999 (27.04.99)	DE
(71)(72) Anmelder und Erfinder:	DREXHAGE, Karl-Heinz [DE/DE]; Schanzenweg 50, D-57076 Siegen (DE).		
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):	ARDEN-JACOB, Jutta [DE/DE]; Am Hügel 25, D-90513 Zirndorf (DE). KEM-NITZER, Norbert [DE/DE]; Kronprinzenstrasse 106, D-57250 Netphen (DE).		
(74) Anwälte:	WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		
(81) Bestimmungsstaaten:	AU, CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		
Veröffentlicht	<i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>		

(54) Title: NOVEL AMIDOPYRYLIUM FLUORESCENCE DYES

(54) Bezeichnung: NEUE AMIDOPYRYLIUM-FLUORESZENZ-FARBSTOFFE

(57) Abstract

The invention relates to the use of amidopyrylium compounds as marker groups in methods for detecting analytes. It further relates to novel amidopyrylium compounds.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Amidopyrylium-Verbindungen als Markierungsgruppen in Verfahren zum Nachweis von Analyten sowie neue Amidopyrylium-Verbindungen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Burbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Eestland						

Neue Amidopyrylium-Fluoreszenz-Farbstoffe

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft die Verwendung von Amidopyrylium-Verbindungen als Markierungsgruppen in Verfahren zum Nachweis von Analyten sowie neue Amidopyrylium-Verbindungen.

Xanthene zählen zu den lange bekannten und gut erforschten 10 Fluoreszenzfarbstoffen. Ein verwandter Farbstoff mit abgewandeltem Grundgerüst, das 3,10-Bis-(dimethylamino)-5-methyl-6-oxo-6H[1]-benzopyrano[3,2-c]chinoliniumkation, wurde von H. Harnisch, Liebigs Ann. Chem. 751, 155-158 (1971), beschrieben.

- 15 Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Pyranen wurden derartige Verbindungen von K.H. Drexhage, Structure and Properties of Laser Dyes, in: F.P. Schäfer, Topics in Applied Physics, Vol. I, Dye Lasers, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, auch als Amidopyrylium-Verbindungen bezeichnet. In dieser Veröffentlichung werden weitere als Farbstoff 140 und 20 141 bezeichnete Amidopyrylium-Verbindungen beschrieben. Ein Hinweis auf die Verwendung von Amidopyrylium-Verbindungen als Fluoreszenz-Markierungsgruppen in der Analytik findet sich nicht in der Literatur.

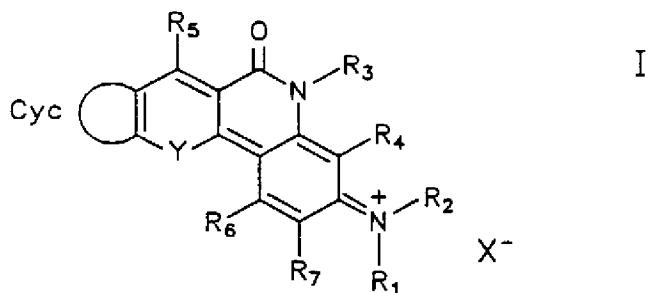
Bisher in der chemischen, medizinischen und biologischen Analytik 25 verwendete Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren meist im Bereich < 600 nm. Daraus ergeben sich bei einer Verwendung als Markierungsgruppe, insbesondere bei biologischen Systemen, gravierende Nachteile: Für diagnostische Systeme ist es zweckmäßig, preisgünstige Lichtquellen wie z.B. Laserdioden (635 bzw. 680 nm) oder Helium-Neon-Laser (633 nm) 30 einsetzen zu können. Um eine wirksame Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffs zu gewährleisten, sollte sein Absorptionsmaximum möglichst in der Nähe der Emissionswellenlänge der verwendeten

Lichtquelle liegen. Dies ist jedoch bei den bekannten Farbstoffen oftmals nicht gegeben. Ferner überschneiden sich in vielen Fällen die Absorptionsspektren der bekannten Farbstoffe mit der Absorption fluoreszierender Substanzen aus biologischen Systemen. Es ist daher wünschenswert, Fluoreszenzfarbstoffe ohne die genannten Nachteile für einen zuverlässigen und genauen Nachweis eines Analyten in einem biologischen System bereitzustellen.

Zur Verwendung als Markierungsgruppe in Nachweisverfahren für Analyten ist neben einer einfachen und zuverlässigen Nachweisbarkeit eine gute Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln, insbesondere in wässrigen Systemen, notwendig. Weiterhin sollten derartige Verbindungen einfach und kostengünstig herzustellen sein und eine gute Haltbarkeit, d.h. Lagerfähigkeit, aufweisen.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand somit darin, geeignete Fluoreszenzfarbstoffe zur Verwendung als Markierungsgruppe für Verfahren zum Nachweis von Analyten bereitzustellen, die insbesondere Absorptionsmaxima aufweisen, die den Einsatz von kostengünstigen Lichtquellen erlauben, außerhalb des Absorptionsbereichs von in biologischen Proben enthaltenen Stoffen absorbieren, gute Löslichkeit zeigen oder/und sich durch eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute auszeichnen, um die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise zu vermeiden.

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



als Markierungsgruppen in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten,
wobei

Y Sauerstoff oder N-R₈ bedeutet,

- 5 R₁, R₂, R₃ und R₈ bei jedem Vorkommen unabhängig Wasserstoff, eine Phenyl-, eine Phenylalkylgruppe mit 1-3 C-Atomen in der Alkylkette, eine Polyether- oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen, vorzugsweise mit bis zu 6 C-Atomen, bedeuten, die gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen,
- 10 Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, oder einer oder mehrere der Reste R₁, R₂, R₃ und R₈ mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden, R₄, R₅, R₆ und R₇ jeweils unabhängig Wasserstoff, Halogen, Phenyl, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo- oder Carboxygruppe oder eine
- 15 Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 15 C-Atomen bedeuten, wobei die Kohlenwasserstoffgruppen Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Cycloalkyl-, Aryl- oder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls jeweils einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy-, Aldehyd-, Alkoxy- oder/und
- 20 Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können,
wobei einer oder mehrere der Reste R₄, R₆ und R₇ mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden können,
- Cyc einen organischen Rest bedeutet, der ein Ringsystem ausgewählt aus aromatischen, heteroaromatischen, chinoiden oder/und cycloaliphatischen Ringen umfaßt, das gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen,

Amino-, Hydroxy-, Sulfo-, Carboxy-, Aldehyd-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, und

- X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen bedeutet.

5

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können als Markierungsgruppen in Verfahren zur qualitativen oder/und quantitativen Bestimmung eines Analyten verwendet werden. Die Bestimmung kann in wässrigen Flüssigkeiten, z.B. Proben von Körperflüssigkeiten wie etwa Blut, Serum,

- 10 Plasma oder Urin, Abwasserproben oder Lebensmitteln, durchgeführt werden. Das Verfahren kann sowohl als Naßtest, z.B. in einer Kuvette, oder als Trockentest auf einem entsprechenden Reagenzträger durchgeführt werden. Die Bestimmung der Analyten kann dabei über eine einzige Reaktion oder durch eine Sequenz von Reaktionen erfolgen.

15

Überraschenderweise zeigte die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I sehr gute Ergebnisse in chemischen und insbesondere in medizinischen und biologischen Nachweisverfahren zur Bestimmung eines Analyten.

20

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in allen bekannten chemischen, medizinischen und biologischen Nachweisverfahren, in denen Fluoreszenzfarbstoffe als Markierungsgruppe geeignet sind, verwendet werden. Derartige Verfahren sind dem Fachmann bekannt und müssen deshalb nicht weiter ausgeführt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Verbindung der allgemeinen Formel I kovalent an einen für den nachzuweisenden Analyten spezifischen Rezeptor gekoppelt. Der spezifische Rezeptor ist jede geeignete Verbindung oder jedes geeignete Molekül, vorzugsweise ist es ein Peptid, Polypeptid oder eine Nukleinsäure. Die Verbindungen I oder Konjugate dieser Verbindung können beispielsweise in Nukleinsäure-

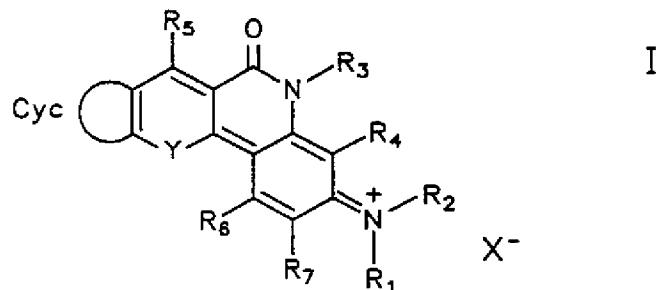
30

Hybridisierungsverfahren oder immunchemischen Verfahren verwendet werden. Derartige Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor.

- 5 Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, neue Amidopyrylium-Verbindungen bereitzustellen, die insbesondere zur Verwendung als Markierungsgruppe in Nachweisverfahren von Analyten geeignet sind und die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise vermeiden.

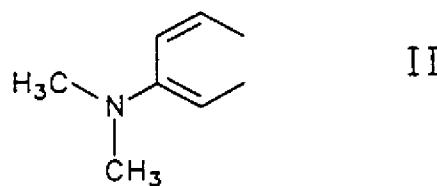
10

Diese Aufgabe wurde gelöst durch eine Verbindung der allgemeinen Formel I

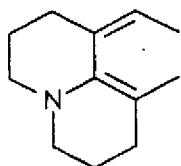


wobei

- 15 Y, R₁-R₇ und Cyc die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen besitzen, X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen bedeutet, mit der Maßgabe, daß wenn Y Sauerstoff, R₁, R₂ und R₃ Methyl und R₄, R₅, R₆ und R₇ Wasserstoff sind,
Cyc keine Struktur der Formeln II oder III



20



III

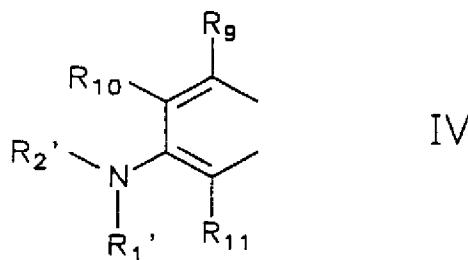
aufweist.

- Ein Vorteil der Verbindungen I ist, daß durch eine fast beliebige
5 Substituentenvariation die Eigenschaften einzelner Verbindungen, z.B. die spektroskopischen Eigenschaften, die Lage der Absorptionsmaxima, die Löslichkeitseigenschaften, die Fluoreszenzabklingzeit und die Höhe der Quantenausbeute, stark variiert und somit wie gewünscht ausgewählt werden können. Auf diese Weise können Interferenzen mit Störsubstanzen in
10 Proben, wie etwa Serum, Blut oder Plasma etc., vermindert oder sogar ganz vermieden werden. Die Herstellung der Verbindungen I kann nach an sich bekannten Methoden auf einfache und kostengünstige Weise erfolgen, wie in den nachfolgenden Beispielen erläutert wird. Ferner sind die Verbindungen unproblematisch handhabbar. Ein weiterer Vorteil der Verbindungen I ist die
15 große Stokes-Verschiebung der Fluoreszenz, wodurch eine gute Abtrennung der Anregungsstrahlung ermöglicht wird. Weiterhin zeichnen sich die Verbindungen durch eine hohe Stabilität aus, was sich insbesondere positiv auf ihre Lagerfähigkeit auswirkt.
20 Bevorzugt bedeutet Y Sauerstoff oder/und R₅ umfaßt ein aromatisches, gegebenenfalls substituiertes Ringsystem.

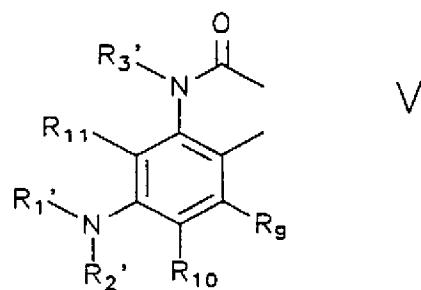
Die Verbindungen weisen vorzugsweise eine zur kovalenten Kopplung fähige Gruppe auf, z.B. -COOH, -NH₂, -OH oder/und -SH. Über diese
25 Kopplungsgruppe kann die Verbindung nach bekannten Methoden an einen Träger oder/und an ein Biomolekül gekoppelt werden. Als Träger kann jedes geeignete Material ausgewählt werden, z.B. poröses Glas, Kunststoffe, Ionenaustauscherharze, Dextrane, Cellulose, Cellulosederivate oder/und

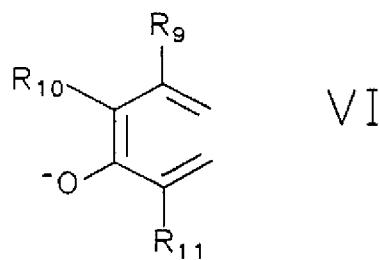
hydrophile Polymere. Die Biomoleküle werden vorzugsweise ausgewählt aus Peptiden, Polypeptiden, Nukleotiden, Nukleosiden, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga oder/und Haptenen.

- 5 Überraschenderweise werden das Absorptionsmaximum und die Fluoreszenzquantenausbeute durch eine Kopplung der erfindungsgemäßen Verbindungen an die oben genannten Träger und Biomoleküle nicht wesentlich verändert.
- 10 In einer bevorzugten Verbindungsklasse sind R₁ mit R₇ oder/und R₂ mit R₄ verbrückt und bilden eine Ringsystem, insbesondere mit 5- oder 6-gliedrigen Ringen. In einer besonders bevorzugten Verbindungsklasse weist Cyc in Formel I eine Struktur der Formeln IV, V oder VI



15



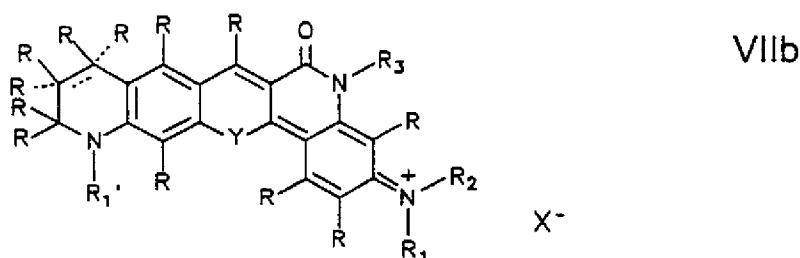
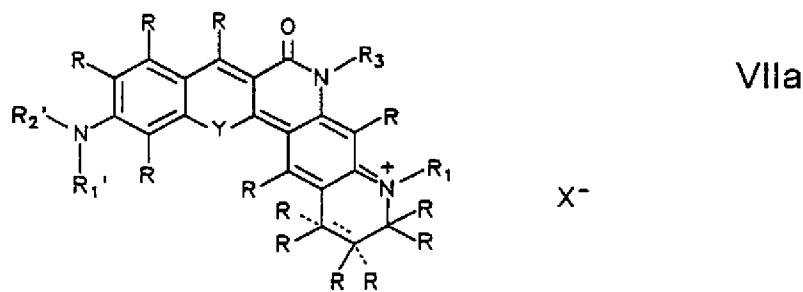


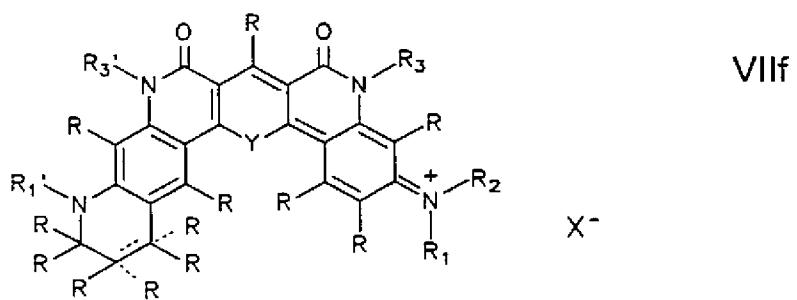
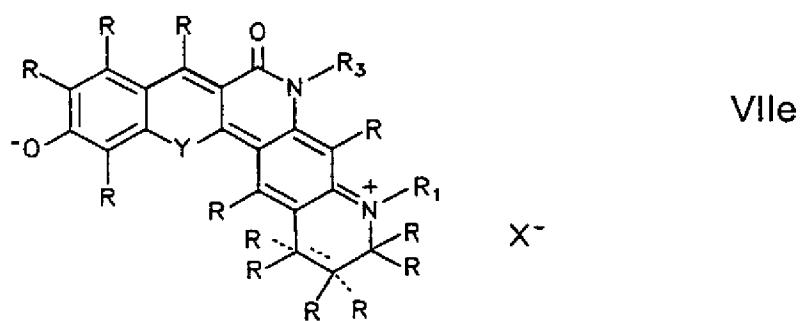
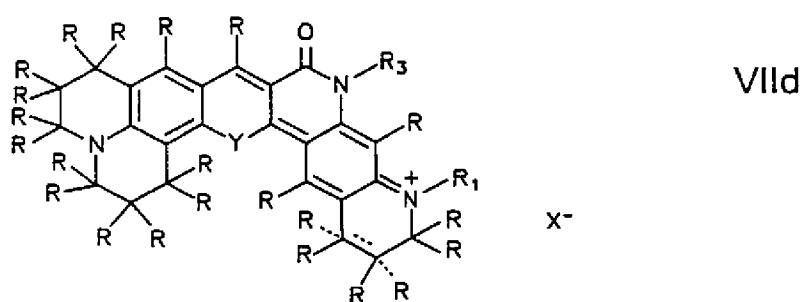
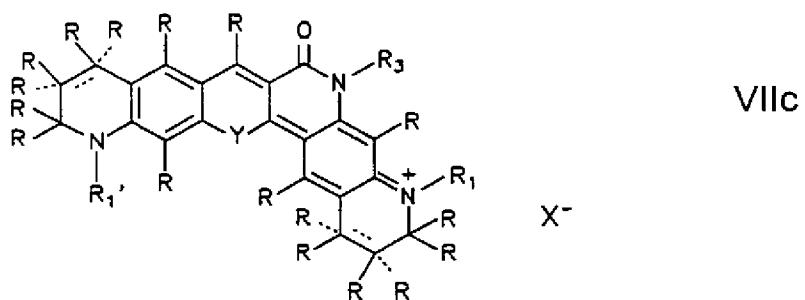
auf, wobei R_1' , R_2' und R_3' wie R_1 , R_2 und R_3 oben definiert sind und R_9 - R_{11} wie R_4 - R_7 oben definiert sind.

5

In einer weiteren bevorzugten Verbindungsklasse sind R_1' mit R_{11} oder/und R_2' mit R_{10} verbrückt und bilden ein Ringsystem, insbesondere einen 5- oder 6-gliedrigen Ring.

10 Beispiele für besonders bevorzugte Verbindungsklassen sind in den allgemeinen Formeln VIIa bis f dargestellt:





die gestrichelten Linien gegebenenfalls Doppelbindungen bedeuten, bei deren Vorhandensein die über eine gestrichelte Linie gebundenen Reste R fehlen,

X, Y, R₁, R₂, R₃, R₁', R₂' und R₃' wie oben definiert sind und R jeweils
5 unabhängig wie R₄ oben definiert ist.

Konkrete Beispiele für erfindungsgemäße Verbindungen sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt.

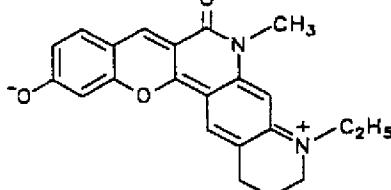
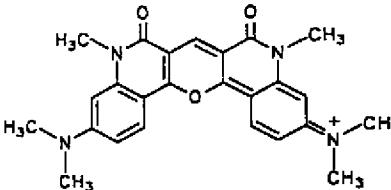
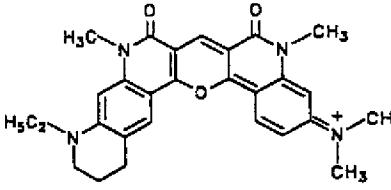
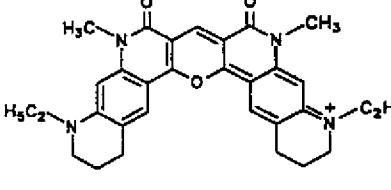
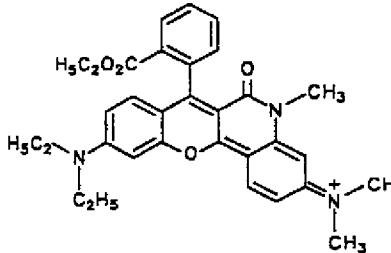
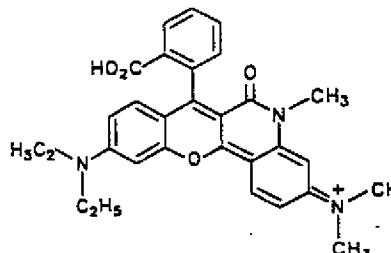
Tabelle 1 Erfindungsgemäße Amidopyrylium-Verbindungen

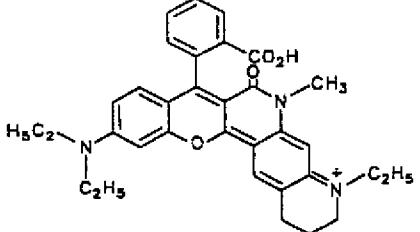
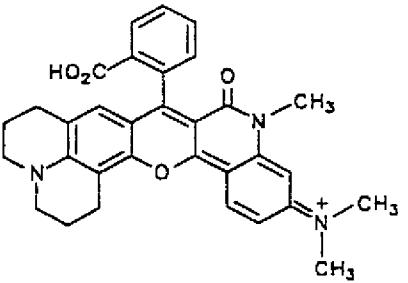
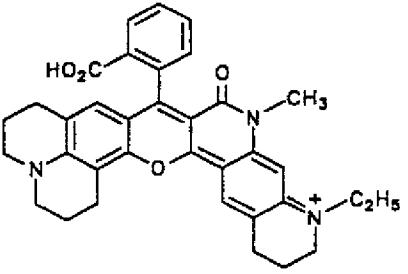
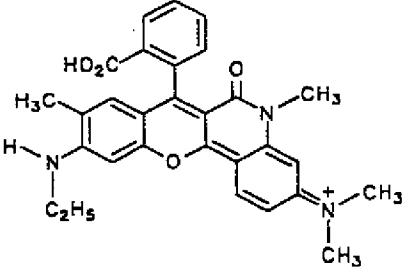
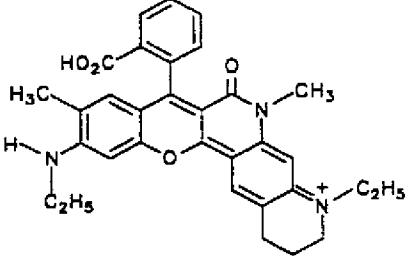
Spektrale Daten in Ethanol:

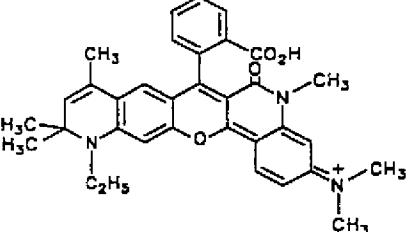
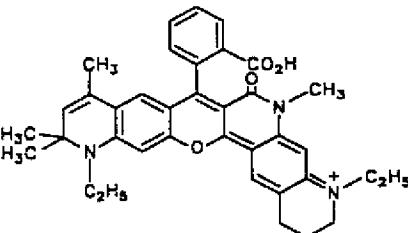
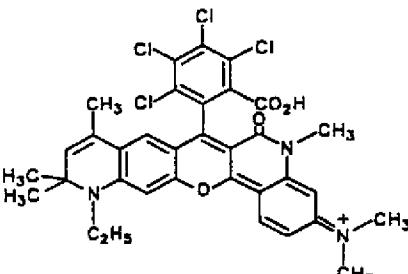
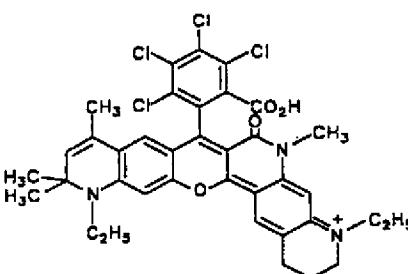
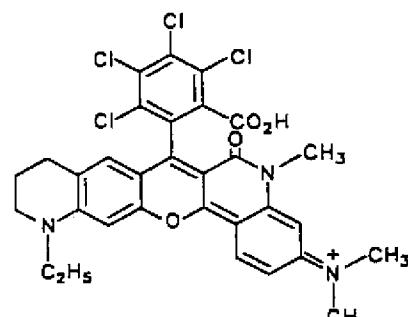
 λ_A : Absorptionsmaximum λ_F : Fluoreszenzmaximum5 Q_F : Fluoreszenzquantenausbeute

	Struktur	λ_A / nm	λ_F / nm	Q_F / %
1 NK 9		595	650	21
2 NK 1		609	668	11
3 NK 8		595	650	34
4 NK 5		609	663	19
5 JA 227		596	651	31

6 Farbstoff 141		602	646	47
7 JA 230		613	665	31
8 JA 226		613	664	37
9 JA 228		628	675	24
10 NK 6		628	680	21
11 NK 4		522	605	21

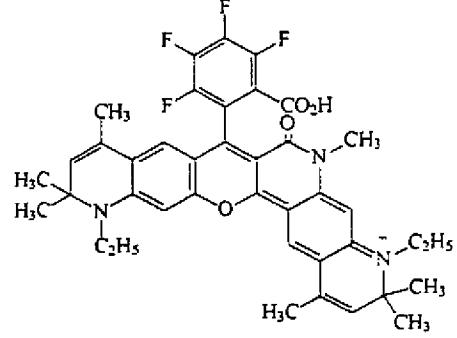
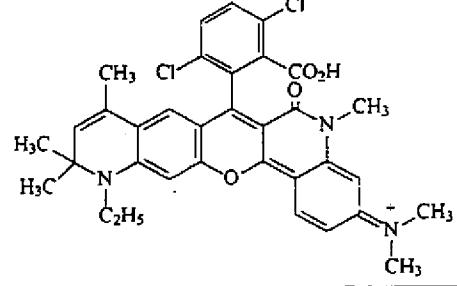
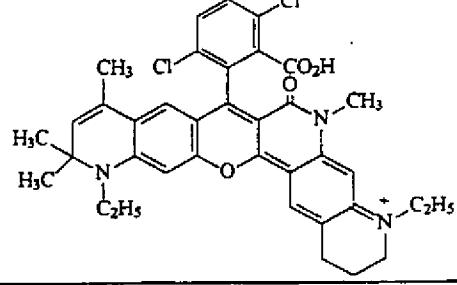
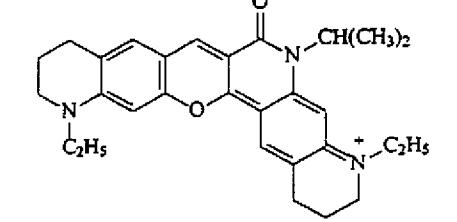
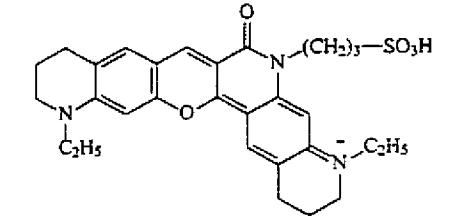
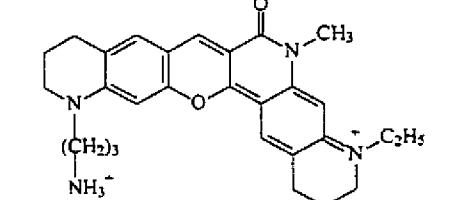
12 NK 7		587	650	15
13 Farbstoff 140		664	715	2
14 NK 2		666	720	1
15 JA 210		682	725	4
16 NK 13		593	650	23
17 NK 13 A		588	645	26

18 NK 14		603	665	14
19 NK 15		597	642	51
20 NK 16		608	660	30
21 NK 19		573	635	17
22 NK 20		589	665	9

23 NK 21		608	655	44
24 NK 22		622	675	25
25 NK 10		640	695	15
26 NK 26		661	716	10
27 NK 17		617	672	20

28 NK 18		631	686	15
29 NK 27		623	678	25
30 NK 28		635	690	30
31 NK 29		622	677	21
32 NK 30		718	770	2

33 NK 31		622	675	35
34 NK 33		611	666	25
35 NK 35		631	686	13
36 NK 36		635	690	15
37 NK 37		677	733	14

38 NK 38		673	725	11
39 NK 24		629	684	30
40 NK 25		643	698	35
41 NK 39		610	664	18
42 NK 40		610	663	20
43 NK 41		609, s	663	18

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert. Die Abbildungen 1, 2 und 3 zeigen die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der erfindungsgemäßen Verbindungen JA 227 (5), NK 13 (16) bzw. NK 14 (18).

Beispiele**Herstellung der Amidopyrylium-Verbindungen****5 A. Farbstoffe mit R₅ = H**

Die Synthese der Vorprodukte erfolgt analog zur Synthesevorschrift von Harnisch und Brack (Liebigs Ann. Chem. 740 (1970), 164 - 168). Die Farbstoffsynthesen werden bei einer auf 100 °C verringerten Reaktionstemperatur durchgeführt. Sie werden exemplarisch anhand der Strukturen 5 (JA 227) und 15 (JA 210) beschrieben. Die Darstellung der Edukte ist im nachfolgenden Beispiel enthalten oder literaturbekannt.

15 Verbindung JA 210**1. Stufe:**

9-Ethyl-4-hydroxy-6,7,8,9-tetrahydro-1H-pyrido[2,3-g]chinol-2-on

20 3,5 g 7-Amino-1-ethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin und 3,7 g Malonsäurediethyl-ester werden auf 180 - 190°C erhitzt. Über eine Kolonne (Länge: 10 cm; Durchmesser: 0,5 cm) wird solange Ethanol abdestilliert, bis sich im Kolben ein Feststoff gebildet hat. Der Feststoff wird in 30 ml Aceton verrührt, abgesaugt und der Niederschlag mit Methanol gewaschen. Der Niederschlag wird über 25 Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 20 g

¹H-NMR-Daten in CDCl₃:

δ 1,1 (T, 3H, -CH₃); 1,8 (M, 2H, -CH₂-); 2,7 (T, 2H, Ar-CH₂-); 3,2 - 3,4 (M, 4H, 2 x N-CH₂-); 5,4 (S, 1H, =CH-); 6,4 (S, 1H, ArH); 7,3 (S, 1H, ArH); 10,5 (S, 1H, -NH); 10,6 (S, 1H, -OH)

2. Stufe:**9-Ethyl-4-methoxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on**

2 g (8,2 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-6,7,8,9-tetrahydro-1H-pyrido[2,3-g]chinol-2-on

5 werden in 25 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 6,7 g (0,12 mol) Kaliumhydroxid versetzt. Dazu tropft man bei max. 60 °C 8,6 g (0,07 mol) Dimethylsulfat (Kühlung mit Eis/Kochsalzbad). Die Suspension wird in 200 ml Wasser ausgetragen. Es bildet sich ein gut filtrierbarer Niederschlag, der abgesaugt und getrocknet wird.

10 Ausbeute: 1,8 g

Smp.: 208 °C unter Zersetzung

¹H-NMR-Daten in CDCl₃:

δ 1,2 (T, 3H, -CH₃); 1,9 (M, 2H, -CH₂-); 2,8 (T, 2H, Ar-CH₂-); 3,2 - 3,4 (M, 4H, 2 x N-CH₂-); 3,6 (S, 3H, -CH₃); 3,8 (S, 3H, -OCH₃); 5,8 (S, 1H, =CH-); 6,3 (S, 1H, ArH); 7,4 (S, 1H, ArH)

3. Stufe:**9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on**

20 0,5 g (1,8 mmol) 9-Ethyl-4-methoxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on werden in 5 ml 10 %-iger Salzsäure 2 h zum Rückfluß erhitzt. Die Suspension wird mit 10 %-iger Natriumacetatlösung auf pH 5 abgestumpft. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Exsikkator getrocknet.

¹H-NMR-Daten in d₆-DMSO:

25 δ 1,1 (T, 3H, -CH₃); 1,9 (M, 2H, -CH₂-); 2,7 (T, 2H, Ar-CH₂-); 3,3 - 3,5 (M, 7H, N-CH₃, 2 x N-CH₂-); 5,5 (S, 1H, =CH-); 6,3 (S, 1H, ArH); 7,4 (S, 1H, ArH); 10,8 (S, 1H, -OH)

4. Stufe:

30 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on-3-carbaldehyd

Zu 3 ml Dimethylformamid tropft man bei 50 - 55 °C 0.4 g Phosphoroxychlorid. Die Lösung wird noch 1 h bei 50 °C verrührt. Anschließend fügt man bei derselben Temperatur unter Röhren 0,5 g (1,8 mmol) 9-Ethyl-4-methoxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on gelöst in 6 ml Dimethylformamid hinzu. Man röhrt noch 5 h bei 80 - 90 °C. Die intensiv gelb gefärbte Lösung wird auf 50 ml Wasser und 10 g Eis ausgetragen und 12 h bei Raumtemperatur verrührt. Der hellgelbe Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet.

Absorptions- und Fluoreszenzmaximum in Ethanol: $\lambda_A = 439$ nm; $\lambda_F = 494$ nm

10 ^1H -NMR-Daten in CDCl_3 :

δ 1,3 (T, 3H, -CH₃); 2,0 (M, 2H, -CH₂-); 2,8 (T, 2H, Ar-CH₂-); 3,5 (M, 4H, 2 x N-CH₂-); 3,6 (S, 3H, N-CH₃); 6,1 (S, 1H, ArH); 7,7 (S, 1H, ArH); 10,4 (S, 1H, -CH=O)

15 5. Stufe:

JA 210

0,18 g (0,69 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on und 0,2 g (0,69 mmol) 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on-3-carbaldehyd werden in 20 ml Eisessig gelöst und 20 min in einem 100 °C warmen Ölbad erhitzt. Die Lösung wird in 100 ml Wasser gegossen und der Niederschlag abfiltriert. Der Farbstoff wird chromatographisch gereinigt.

10 ^1H -NMR-Daten in DMSO-d_6 :

25 δ 1,3 (T, 6H, -CH₃); 1,9 (S, 4H, -CH₂-); 2,7 (S, 4H, Ar-CH₂-); 3,4 (S, 6H, N-CH₃); 3,6 (M, 8H, 2 x N-CH₂-); 6,2 (S, 2H, ArH); 7,6 (S, 2H, ArH); 8,5 (S, 1H, -CH=)

Verbindung JA 227

30

1,2 g (4,5 mmol) 4-(7-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrochinol-1-yl)-buttersäureethylester und 1,2 g (4,5 mmol) 4-Chlor-7-dimethylamino-1-methyl-

chinol-2-on-3-carbaldehyd werden in 50 ml Eisessig gelöst und 5 min in einem 100 °C warmen Ölbad erhitzt. Die Lösung wird in 500 ml 15 %-iger Natriumchloridlösung getropft und der Niederschlag abfiltriert. Der Farbstoff wird chromatographisch gereinigt.

5

B. Farbstoffe mit R₅ = (substituierter) Phenyl-Ring

Eine bevorzugte Darstellung der Verbindungen wird exemplarisch anhand der 10 Strukturen 18 (NK 14), 20 (NK 16) und 23 (NK 21) vorgestellt. Die Eduktsynthesen werden, soweit diese nicht literaturbekannt sind, analog zu den in Teil A beschriebenen Beispielen durchgeführt. Die Synthese der Benzoyl-benzoësäure-Derivate erfolgt analog zur literaturbekannten Darstellung des 6-(2-Carboxy-3,4,5,6-tetrachlorbenzoyl)-1-ethyl-7-hydroxy- 15 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolins.

Verbindung NK 14

20 1,2 g (3,9 mmol) 2-(4-Dimethylamino-2-hydroxy)-benzoyl-benzoësäure und 1,0 g (3,9 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on werden in 40 ml 1,1,2,2-Tetrachlorethan bis zur vollständigen Auflösung der Substanzen zum Rückfluß erhitzt. Nun werden insgesamt 5 g Phosphorpentoxid portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung 25 weitere drei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird die Mischung mit je 50 ml Wasser und Chloroform aus dem Kolben gelöst und nach dem Abtrennen der organischen Phase wird die Wasserphase noch dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zur Trockene einrotiert und der Farbstoff anschließend 30 säulenchromatographisch gereinigt.

Die Farbstofffraktionen werden einrotiert, der Rückstand in 50 ml Ethanol aufgelöst und nach der Zugabe von 10 ml Perchlorsäure (60 %-ig) durch

Zutropfen von Wasser ausgefällt. Nach dem Absaugen wird das Farbstoffperchlorat sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 700 mg

5

Verbindung NK 16

- 0,75 g (2,22 mmol) 9-(2-Carboxybenzoyl)-8-hydroxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo[*ij*]chinolizin und 0,57 g (2,22 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-*g*]chinol-2-on werden in 40 ml 1,1,2,2-Tetrachlorethan bis zur vollständigen Auflösung der Substanzen zum Rückfluß erhitzt. Nun werden insgesamt 5 g Phosphorpentoxid portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung weitere drei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird die Mischung mit je 50 ml Wasser und Chloroform aus dem Kolben gelöst und nach dem Abtrennen der organischen Phase wird die Wasserphase noch dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zur Trockene einrotiert und der Farbstoff anschließend säulenchromatographisch gereinigt.
- Die Farbstofffraktionen werden einrotiert, der Rückstand in 50 ml Ethanol aufgelöst und nach der Zugabe von 10 ml Perchlorsäure (60 %-ig) durch Zutropfen von Wasser ausgefällt. Nach dem Absaugen wird das Farbstoffperchlorat sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.
- Ausbeute: 160 mg

Verbindung NK 21

- 1,13 g (3,1 mmol) 6-(2-Carboxybenzoyl)-1-ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydro-chinolin und 0,68 g (3,1 mmol) 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-chinol-2-on werden in 60 ml 1,1,2,2-Tetrachlorethan bis zur

vollständigen Auflösung der Substanzen zum Rückfluß erhitzt. Nun werden insgesamt 4 g Phosphorpentoxid portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung weitere drei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird die Mischung mit je 50 ml Wasser und Chloroform aus dem
 5 Kolben gelöst und nach dem Abtrennen der organischen Phase wird die Wasserphase noch dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zur Trockene einrotiert und der Farbstoff anschließend säulenchromatographisch gereinigt.
 Die Farbstofffraktion wird einrotiert, der Rückstand in 25 ml Ethanol aufgelöst
 10 und nach der Zugabe von 8 ml Perchlorsäure (60 %-ig) durch Zutropfen von Wasser ausgefällt. Nach dem Absaugen wird das Farbstoffperchlorat sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

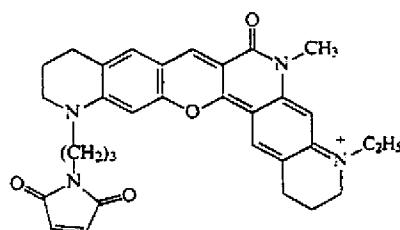
Ausbeute: 50 mg

15

C. Beispiele zur Konjugatbildung

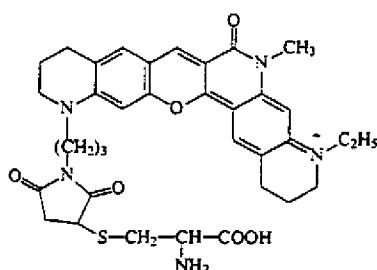
NK 41-Maleinimid

20 100 mg NK 41 (0.2 mmol) werden in 10 ml getrocknetem DMSO gelöst und mit 100 mg (1 mmol) Maleinsäureanhydrid versetzt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur ca. 24 h verrührt. Man tropft 50 ml einer 10 %igen wäßrigen Natriumperchloratlösung hinzu und filtriert den ausgefallenen Feststoff ab. Der Feststoff wird mit 25 mg Natriumacetat in 5 ml Essigsäureanhydrid
 25 suspendiert und für 30 min auf etwa 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen tropft man 30 ml der 10 %igen Natriumperchloratlösung hinzu, filtriert und trocknet den Feststoff.

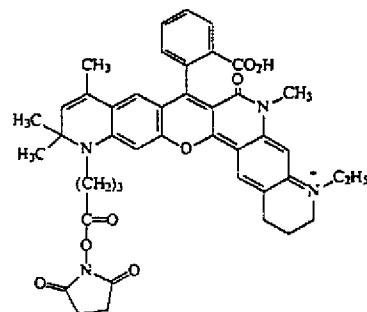


NK 41-Maleinimid-Cystein-Konjugat

70 mg (0.16 mmol) NK 41-Maleinimid wird in 20 ml Ethanol gelöst und portionsweise mit 22 mg (0.16 mmol) Cystein versetzt. Man verröhrt bei Raumtemperatur und tropft nach 30 min etwa 50 ml einer 10 %igen Natriumperchloratlösung hinzu. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und getrocknet.

**10 NK 27-Aktivester**

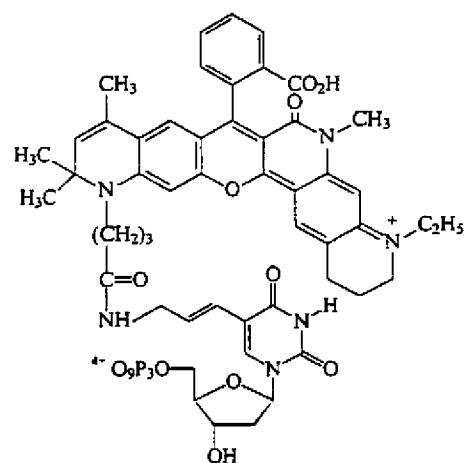
50 mg (0.1 mmol) NK 27 werden mit 0.2 mmol N-Hydroxysuccinimid und 0.2 mmol Dicyclohexylcarbodiimid in 20 ml Acetonitril gelöst. Man lässt 5 h bei Raumtemperatur röhren und rotiert das Produktgemisch ein. Die Reinigung erfolgt chromatographisch.



15

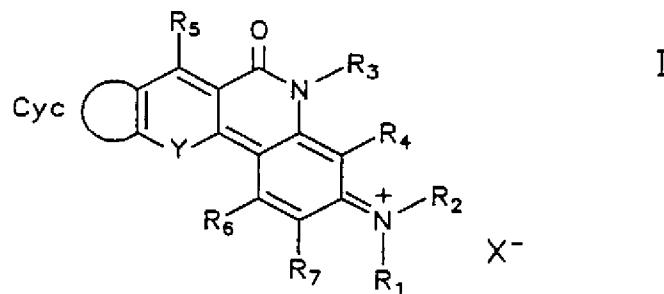
NK 27-dUTP-Konjugat

10 mol 5-(3-Aminoallyl)-dUTP werden in 0.5 ml 0.1 M Natriumborat-Puffer (pH 8) gelöst und mit einer Lösung aus 5 mol NK 27-Aktivester in 1 ml aminfreiem Dimethylformamid versetzt. Die Lösung wird 15 h bei Raumtemperatur geröhrt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand chromatographisch gereinigt.



Ansprüche

1. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



5 als Markierungsgruppen in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten, wobei

Y Sauerstoff oder N-R₈ bedeutet,

10 R₁, R₂, R₃ und R₈ bei jedem Vorkommen unabhängig Wasserstoff, eine Phenyl, eine Phenylalkylgruppe mit 1-3 C-Atomen in der Alkylkette, eine Polyether- oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen, vorzugsweise mit bis zu 6 C-Atomen, bedeuten, die gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, oder einer oder

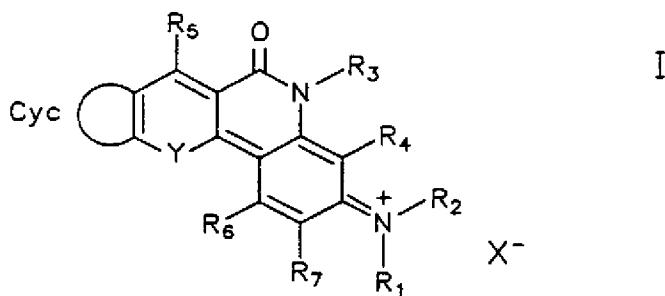
15 mehrere der Reste R₁, R₂, R₃ und R₈ mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden,

R₄, R₅, R₆ und R₇ jeweils unabhängig Wasserstoff, Halogen, Phenyl, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo- oder Carboxygruppe oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 15 C-Atomen bedeuten, wobei die

20 Kohlenwasserstoffgruppen Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Cycloalkyl-, Aryl- oder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls jeweils einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy-, Aldehyd-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können,

25 wobei einer oder mehrere der Reste R₄, R₆ und R₇ mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden können,

- Cyc einen organischen Rest bedeutet, der ein Ringsystem, ausgewählt aus aromatischen, heteroaromatischen, chinoiden oder/und cycloaliphatischen Ringen umfaßt, das gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Amino-, Hydroxy-, Sulfo-, Carboxy-, Aldehyd-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, und
- gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen bedeutet.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Verbindung I kovalent an einen für den nachzuweisenden Analyten spezifischen Rezeptor gekoppelt wird.
- 15 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Nachweisverfahren aus Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren und immunchemischen Verfahren ausgewählt wird.
- 20 4. Verbindungen der allgemeinen Formel I



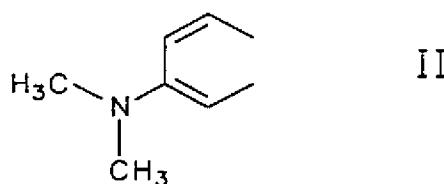
wobei

Y, R₁-R₇ und Cyc die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen

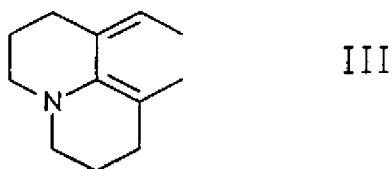
besitzen,

X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen

bedeutet,
 mit der Maßgabe, daß wenn Y Sauerstoff, R₁, R₂ und R₃ Methyl und R₄,
 R₅, R₆ und R₇ Wasserstoff sind,
 Cyc keine Struktur der Formeln II oder III



5



aufweist.

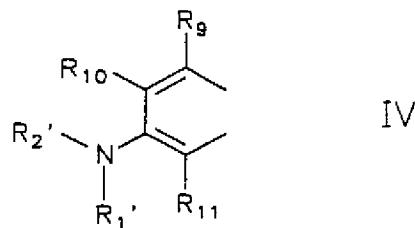
5. Verbindungen nach Anspruch 4,

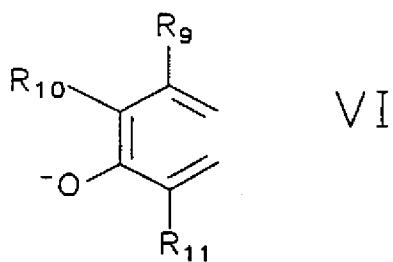
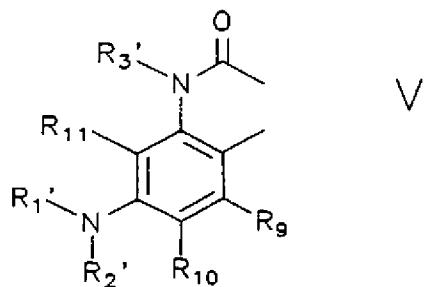
10 dadurch gekennzeichnet,

daß R₁ mit R₇ oder/und R₂ mit R₄ verbrückt sind und ein Ringsystem,
 insbesondere einen 5- oder 6-gliedrigen Ring, bilden.

6. Verbindungen der Formel I nach Anspruch 4 oder 5, worin Cyc eine

15 Struktur der Formeln IV, V oder VI





aufweist, wobei

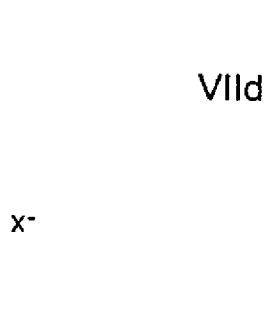
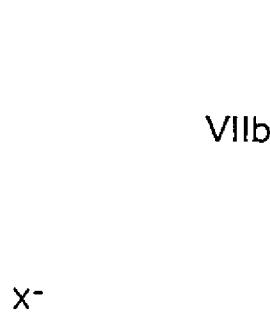
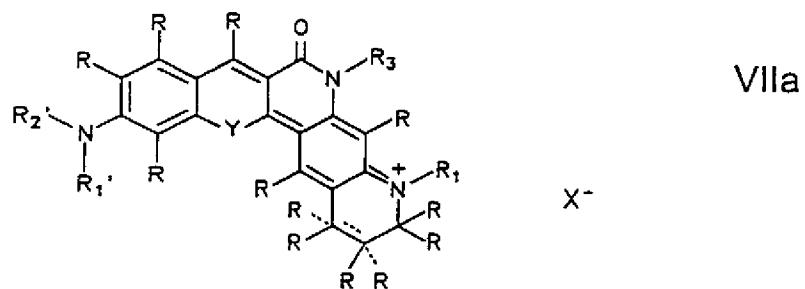
5 R_1' , R_2' und R_3' wie R_1 , R_2 und R_3 in Anspruch 1 definiert sind, und R_9 -
 R₁₁ wie R₄-R₇ in Anspruch 1 definiert sind.

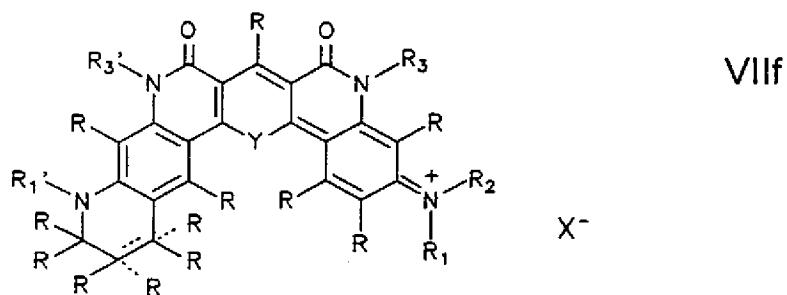
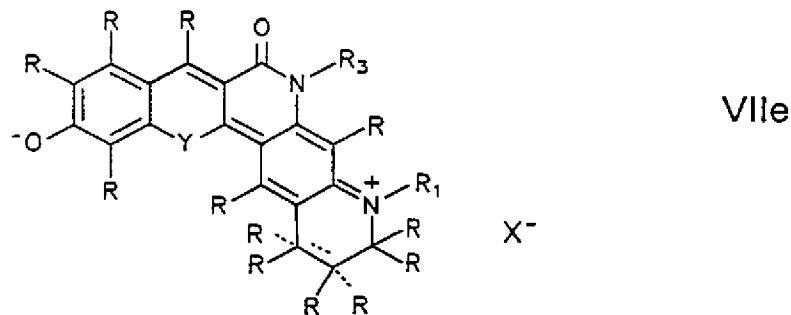
7. Verbindungen nach Anspruch 6,

dadurch gekennzeichnet,

10 daß R_1' mit R₁₁ oder/und R_2' mit R₁₀ verbrückt sind und ein Ringsystem,
 insbesondere einen 5- oder 6-gliedrigen Ring bilden.

8. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 7, die einer der
 allgemeinen Formeln VIIa-f entsprechen





5 wobei

die gestrichelten Linien gegebenenfalls Doppelbindungen bedeuten und bei Vorhandensein der Doppelbindungen die über eine gestrichelte Linie gebundenen Reste R fehlen,

X, Y, R₁, R₂ und R₃ wie in Anspruch 4 und 5 definiert sind,

10 R₁', R₂' und R₃' wie in Anspruch 6 und 7 definiert sind, und

R jeweils unabhängig wie R₄ in Anspruch 4 definiert ist.

9. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,

15 daß Y Sauerstoff ist.

10. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,

daß R₅ ein aromatisches, gegebenenfalls substituiertes Ringsystem

umfaßt.

11. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß sie eine zur kovalenten Kopplung fähige Gruppe aufweisen.

12. Verbindungen nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Kopplungsgruppe -COOH, -NH₂, -OH oder/und -SH ist.

10

13. Verbindungen nach Anspruch 11 oder 12.,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie über Kopplungsgruppen an einen Träger oder/und an ein
Biomolekül gekoppelt sind.

15

14. Verbindungen nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Träger ausgewählt ist aus porösem Glas,
Ionenaustauscherharzen, Kunststoffen, Dextranen, Cellulose,
20 Cellulosederivaten oder/und hydrophilen Polymeren.

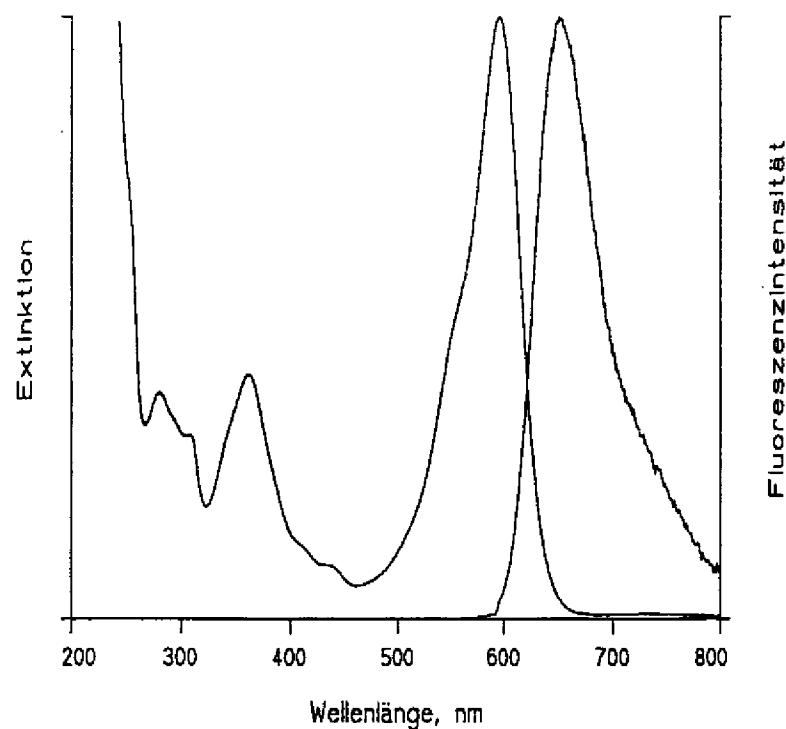
25

15. Verbindungen nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Biomolekül ausgewählt ist aus Peptiden, Polypeptiden,
Nukleotiden, Nukleosiden, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanalogen
oder/und Haptenen.

Absorptions- und Fluoreszenzspektren in Ethanol

5

Abbildung 1: JA 227



10

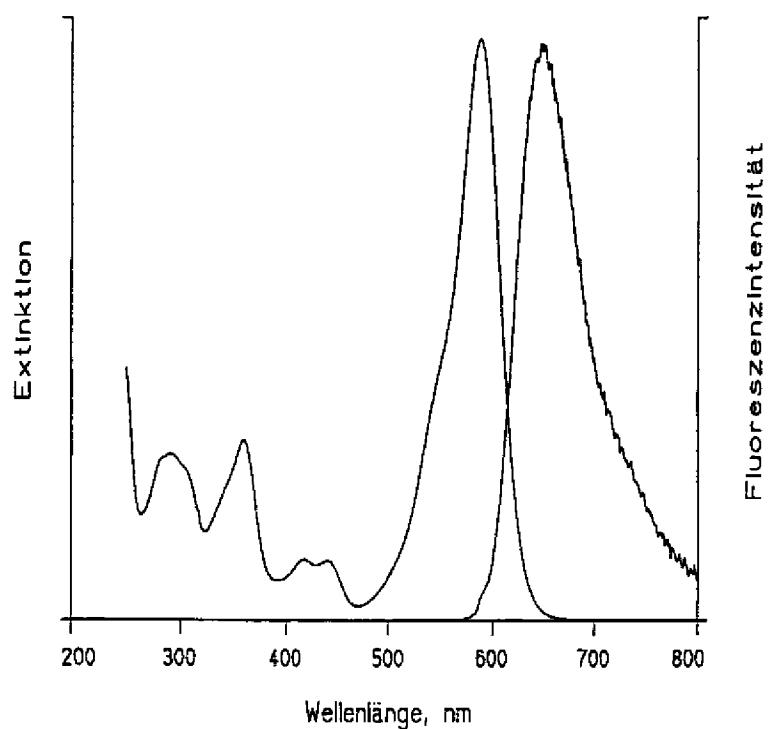
15

20

25

5 Abbildung 2: NK 13

10



15

5 Abbildung 3: NK 14

10

